加味关节康对佐剂性关节炎大鼠免疫性炎症的影响

韩宏妮*, 陈立忠, 詹蓓, 姬艳波, 宋媛媛, 许月梅, 王海燕
(解放军第 208 医院中医风湿科, 长春 130062)

[摘要] 目的: 探讨加味关节康对佐剂性关节炎大鼠免疫性炎症的影响。方法: 53 只大鼠随机分为 4 组: 正常组、模型组、加味关节康剂治疗组及雷公藤多甙片组, 除正常组外其余大鼠制备佐剂性关节炎模型。治疗组分别用加味关节康、雷公藤多甙片 ig; 于药后 1, 2, 3 周测大鼠左后足趾肿胀度及关节炎指数评分。用药后 3 周测定血清白介素(IL)-4、8、10、12, 肿瘤坏死因子(TNF)-α和干扰素(IFN-γ)水平, 观察大鼠滑膜组织病理形态学变化。结果: 用药后治疗组关节肿胀度及关节炎指数均小于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$); 用药 3 周后各治疗组血清 TNF-α、IFN-γ、IL-8、IL-12 水平均低于模型组($P < 0.01$); IL-4、IL-10 水平均高于模型组($P < 0.05$); 各治疗组与模型组比较滑膜组织增生程度明显减轻, 炎症细胞浸润程度稍减轻。结论: 加味关节康治疗可明显下调佐剂性关节炎大鼠相关致炎性细胞因子 TNF-α、IFN-γ、IL-8、IL-12 水平, 并上调抗炎性细胞因子 IL-4、IL-10 的水平, 可减轻滑膜增生程度, 改善关节肿胀, 疗效肯定。

[关键词] 类风湿关节炎; 加味关节康; 细胞因子; 滑膜细胞
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)03-0077-03

类风湿性关节炎(RA)是一种以对称性、多关节炎为主要表现的慢性、全身性自身免疫性疾病, 滑膜增生、关节软骨和骨破坏, 最终关节畸形和功能丧失。为寻找副作用小、且能控制类风湿病情进展的中药复方制剂, 于 2007 年 10 ~12 月在解放军第 208 医院动物实验室进行了动物实验。现报告如下:

1 材料

1.1 动物 清洁级 Wistar 雄性大鼠 53 只, 吉林大学基础医学院实验动物中心提供, 合格证号吉 2003-0001, 体重(190 ±10) g。实验期间大鼠自由摄食和饮水。

1.2 药物与试剂 关节康颗粒, 解放军第 208 医院提供, 批号: 070603; 雷公藤多甙片, 上海复旦复华药业提供, 批号: 090802。完全弗氏佐剂, 美国 Sigma 公司提供; TNF-α、IFN-γ、IL-4、IL-8、IL-10、IL-12 ELISA 诊断试剂盒, 众磊(北京)生物科技发展有限公司驻沪办提供。

1.3 仪器 YLS-7A 型足趾容积测量仪; LXJ-Ⅱ离心沉淀仪, 上海医用分析仪器厂制造; DG-5031 型酶联免疫检测仪, 华东电子管厂制造; Olympus 图像分析仪(日本)。

2 方法

2.1 造模、分组与给药 53 只雄性大鼠适应性喂养 5 d, 随机抽取 11 只为正常组, 其余 42 只大鼠造模: 左后足垫皮内注射完全弗氏佐剂(CFA) 0.1 mL/只[1] 制备佐剂性关节炎模型。17 d 造模成功, 将造模成功动物分为 3 组: 加味关节康组(8.37 g·kg^{-1}) ig、雷公藤多甙片组(4.5 g·kg^{-1}) ig 和模型组。正常对照组和模型组 ig 等量自来水, 共 3 周。

2.2 取材 用药后 3 周, 摘眼球取血 5 ~6 mL, 离心分离血清, -20℃保存检测备用。摘取左后足踝关节, 将整个踝关节纵向切开, 于 10% 中性福尔马林固定 24 h, 并于 3% 硝酸溶液脱钙 30 h, 常规制片, 厚度 4 μm, HE 染色, 光镜下观察病理组织形态学变化。

2.3 观察指标

2.3.1 大鼠左后足踝关节肿胀度测定, 注射 CFA 前后之差值为足趾肿胀度。

2.3.2 关节炎指数评定, 采用关节炎评分法(0 ~4 分)[1]。

2.3.3 血清细胞因子测定 测定大鼠眼球血血清 TNF-α、IFN-γ、IL-4、IL-8、IL-10、IL-12 水平, 用 ELISA 方法测定。

2.3.4 关节滑膜软组织病理形态学变化 在光镜

[收稿日期] 2009-03-17
[基金项目] 吉林省科技厅中医药研发基金(20060920)
[通讯作者] * 韩宏妮, Tel: (0431) 86988050

下观察,评定关节组织病理形态学改变,按程度分为 1 ~3 级,标准如下:

关节病理变化	1 级	2 级	3 级
滑膜增生	层次增多	滑膜增厚	绒毛形成
淋巴细胞	弥漫散在	聚集成团	滤泡形成
血管增生	内皮肿胀	官腔闭塞	细胞成团
纤维素渗出	斑点状	彩带状	巢团状

2.4 统计学分析 计量数据比较采用 t 检验,滑膜组织病理形态学病变分析采用秩和检验,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 各组大鼠足趾肿胀度比较 用药后 2 周、3 周加味关节康组和雷公藤多甙片组大鼠足趾肿胀度明显低于模型组,差异显著($P < 0.01$) ;加味关节康组肿胀度略高于雷公藤多甙片组。见表 1。

表 1 各组大鼠左后足肿胀度比较(聊±s)

组别	n	造模后 17 d	给药 1 周	给药 2 周	给药 3 周
正常组	11	0.18 ±0.04 2)	0.21 ±0.06 2)	0.25 ±0.05 2)	0.29 ±0.07 2)
模型组	10	0.69 ±0.14	0.78 ±0.12	0.73 ±0.15	0.62 ±0.17
加味关节康组	10	0.72 ±0.16	0.72 ±0.13	0.54 ±0.12 2)	0.41 ±0.14 2)
雷公藤多甙片组	10	0.72 ±0.11	0.71 ±0.10	0.56 ±0.08 2)	0.39 ±0.09 2)

注: 与模型组比较 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$(下同)

3.2 各组大鼠多关节炎指数的变化 用药后 2 周、3 周,加味关节康组和雷公藤片组的大鼠关节炎指数低于模型组,差异显著($P < 0.05$, $P < 0.01$) 。

表 2 各组大鼠多关节炎指数比较(聊±s)

组别	n	造模后 17 d	给药 1 周	给药 2 周	给药 3 周
模型组	11	9.30 ±0.95	9.30 ±1.14	8.90 ±1.13	8.20 ±1.15
加味关节康组	10	9.30 ±1.05	8.60 ±1.13	7.20 ±1.07 1)	4.40 ±0.95 2)
雷公藤多甙片组	10	9.20 ±1.04	8.20 ±0.98	7.10 ±1.17 1)	4.10 ±1.03 2)

表 3 用药 3 周后各组大鼠血清 TNF-α、IFN-γ、IL-8、IL-12 水平的比较(μg · L - 1, 聊±s)

组别	n	TNF-α	IFN-γ	IL-8	IL-12
正常组	11	0.329 ±0.041 2)	0.636 ±0.042 2)	0.245 ±0.097 2)	0.157 ±0.046 2)
模型组	10	0.793 ±0.048	0.958 ±0.082	0.734 ±0.063	0.288 ±0.047
加味关节康组	10	0.396 ±0.038 2)	0.697 ±0.044 2)	0.550 ±0.071 2)	0.162 ±0.036 2)
雷公藤片组	10	0.380 ±0.041 2)	0.691 ±0.035 2)	0.321 ±0.082 2)	0.163 ±0.033 2)

3.3 各组大鼠细胞因子水平的比较 表 3 结果表明,用药 3 周后加味关节康组和雷公藤多甙片组大鼠血清 TNF-α、IFN-γ、IL8、IL-12 水平明显低于模型组($P < 0.01$) 。表 4 结果表明,用药 3 周后模型组大鼠血清 IL-4 水平低于正常组($P < 0.05$) ,血清 IL-10 水平与正常组相似。用药 3 周后加味关节康组血清 IL-4、IL-10 水平均高于模型组($P < 0.01$) ;雷公藤组亦高于模型组($P < 0.05$) 。

表 4 用药后 3 周各组大鼠血清 IL-4、IL-10 水平的比较(聊±s, μg · L - 1)

组别	n	IL-4	IL-10
正常组	11	0.534 ±0.039 1)	0.352 ±0.052
模型组	10	0.419 ±0.105	0.323 ±0.049
加味关节康组	10	0.645 ±0.088 2)	0.509 ±0.090 2)
雷公藤片组	10	0.536 ±0.102 1)	0.408 ±0.088 1)

3.4 各组大鼠关节滑膜组织病理形态学改变 正常组后足踝关节组织切片正常。模型组后足踝关节部分关节面软骨细胞排列不整,有轻度退行性变。加味关节康组和雷公藤多甙片组上述病变较模型组轻,主要表现在滑膜细胞层可达 3 ~4 层,关节软组织内炎症细胞数量减少,偶有血管内皮肿胀,但少见血管翳形成及血管管腔闭塞。与模型组比较,两治疗组大鼠足踝关节滑膜组织病理损伤均明显减轻($P < 0.05$) 。见表 5。

表 5 用药 3 周后各组大鼠左后足踝关节组织病理改变比较(聊±s, $n = 10$)

组别	关节病变分级		
	1 级	2 级	3 级
模型组	0	6	4
加味关节康组	5	3	2 1)
雷公藤组	6	2	2 1)

4 讨论

RA 的病因尚不明确,滑膜炎性增生是 RA 的重要病理特征。本实验证实了佐剂性关节炎模型动物出现关节肿胀,甚者出现关节变形、功能丧失等表现。细胞因子测定的结果表明,血清促炎因子 TNF-α、IFN-γ及 IL-8、IL-12 的水平增高,而抑炎因子 IL-4、IL-10 的水平降低。病理形态学检查结果亦表明,出现了较典型的 RA 关节滑膜组织病理形态学改变。说明造模成功。

加味关节康由天南星、白芥子、山茱萸、穿山龙、苍耳子、辛夷、山慈菇等药物组成。方中天南星祛风燥湿、化痰散结、通络止痛,白芥子豁痰散结、温通经络、消肿止痛,山茱萸补益肝肾、温暖腰膝、安利五脏、逐寒湿痹,3 药共为君药,共建温散豁痰通络之功;穿山龙活血舒筋、祛痰利水,苍耳子散风祛湿、通络止痛、流利关节、祛风散结,共为臣药,以达利水通